

JP5310657**Publication number:** JP5310657**Publication date:** 1993-11-22**Inventor:** URA DAISUKE; YANAKA MAKOTO; FUKUHARA
NOBUHIRO**Applicant:** MITSUI TOATSU CHEMICALS**Classification:****- international:** C07C227/40; C07C229/24; C07C229/36; C07C227/00;
C07C229/00; (IPC1-7): C07C229/24; C07C227/40;
C07C229/36**- european:****Application number:** JP19920118893 19920512**Priority number(s):** JP19920118893 19920512**Report a data error here****Abstract of JP5310657**

PURPOSE: To efficiently recover a constituent amino acid of peptides by hydrolyzing the peptides with a strong acidic cation exchange resin. **CONSTITUTION:** An aqueous solution containing peptides having free amino groups is passed through an H<+> type strong acidic cation exchange resin to make the peptides on the ion exchange resin adsorbed, which is then heated to carry out the hydrolytic reaction of the peptides at 70-140 deg.C for 2-60hr. An aqueous solution of an alkali (e.g. aqueous ammonia) or an aqueous solution of a mineral acid salt (e.g. an aqueous solution of a nitrate) is subsequently passed through the ion exchange resin to elute the respective amino acids and afford the amino acids constituting the peptides. Two or more amino acids are respectively bonded through peptide bond to form the peptides and an oligopeptide is exemplified as the peptides. An aqueous solution containing the peptides is a filtrate or a filtration wash liquid formed in producing the peptides by reaction, then filtering and recovering the peptides from the reactional solution.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-310657

(43) 公開日 平成5年(1993)11月22日

| | | | | |
|---------------------------|------|---------|-----|--------|
| (51) Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 府内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
| C 07 C 229/24 | | 8930-4H | | |
| 227/40 | | 8930-4H | | |
| 229/36 | | 8930-4H | | |

審査請求 未請求 請求項の数9(全6頁)

| | | |
|-----------|-----------------|-------------------------------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願平4-118893 | (71) 出願人 000003126 三井東圧化学株式会社 東京都千代田区霞が関三丁目2番5号 |
| (22) 出願日 | 平成4年(1992)5月12日 | (72) 発明者 浦 大輔 福岡県大牟田市浅牟田町30 三井東圧化学 株式会社内 |
| | | (72) 発明者 谷中 誠 福岡県大牟田市浅牟田町30 三井東圧化学 株式会社内 |
| | | (72) 発明者 福原 信裕 福岡県大牟田市浅牟田町30 三井東圧化学 株式会社内 |

(54) 【発明の名称】 ペプチド類からアミノ酸を回収する方法

(57) 【要約】

【目的】 ペプチド類を加水分解してその構成アミノ酸
を効率良く回収する。

【構成】 ペプチド類を含む水溶液を強酸性陽イオン交
換樹脂に通液、吸着させ、該イオン交換樹脂を加熱し
て、ペプチド類を加水分解反応させ、アミノ酸を回収す
る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】ペプチド類を含む水溶液をH⁺型強酸性陽イオン交換樹脂に通液し、ペプチド類をイオン交換樹脂に吸着させ、該イオン交換樹脂を加熱してペプチド類を加水分解反応させ、アミノ酸を回収することを特徴とするペプチド類からアミノ酸を回収する方法。

【請求項2】H⁺型強酸性陽イオン交換樹脂によるペプチド類の加水分解反応後、該樹脂よりアミノ酸類を溶離するために、アルカリ水溶液または鉱酸塩水溶液を該樹脂に通液し、該アミノ酸類を回収することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】ペプチド類が遊離のアミノ基を持つオリゴペプチドであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項4】ペプチド類がα-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル（以下α-APMと略記する）の製造工程において生じる側流に含まれることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項5】α-APMの製造工程において生じる側流に含まれるペプチド類からL-フェニルアラニンおよびL-アスパラギン酸を回収するにあたり、該側流をイオン交換樹脂に通液し、ペプチド成分を該イオン交換樹脂に吸着させた後、該イオン交換樹脂を加熱してペプチドを加水分解反応させた後、該イオン交換樹脂よりL-フェニルアラニン及びL-アスパラギン酸を溶離し、各アミノ酸を分離回収することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項6】側流がN-置換-L-アスパラギン酸誘導体とL-フェニルアラニンメチルエステルを原料としてα-APMを製造する方法で生じるものであることを特徴とする請求項4または5記載の方法。

【請求項7】溶離のアルカリ水溶液がアンモニア水、N_aOH水溶液であることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項8】陽イオン交換樹脂がスルfonyl酸基を交換基とすることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項9】加水分解の温度条件が70℃から140℃であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はペプチド類を合成及び精製する各工程において生じる該ペプチド類の副生物及び未回収ペプチド類において遊離のアミノ基を有するペプチド化合物を、強酸性陽イオン交換樹脂により加水分解して、該ペプチド類を構成するアミノ酸を回収する方法に関する。

【0002】更に詳しくは、遊離のアミノ基を有するペプチド類を含む水溶液をH⁺型強酸性陽イオン交換樹脂に通液し、該ペプチド類をイオン吸着させた後、該イオン交換樹脂を加熱し、ペプチド類の加水分解反応を行い、加水分解反応後、該イオン交換樹脂にアルカリもし

くは鉱酸塩水溶液を通液し、各アミノ酸を溶出させ該ペプチド類を構成するアミノ酸を回収する方法に関する。

【0003】

【従来の技術】ペプチド製造法に関しては、既にこれまで色々な方法が提案されている。たとえば、α-APMはペプチド人工甘味料として産業上有用な物質であり、該化合物の製造は保護基をつけたL-アスパラギン酸誘導体とL-フェニルアラニンメチルエステルとの縮合反応が開示されている。これらの縮合反応においては、目的のα-異性体の他に無視できない量のβ-APM、すなわちN-保護基-β-L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステルを副生する。また、α-APM製造工程における精製工程においても再結晶濾液のような側流には無視できない量のα-APMや関連化合物が溶解して損失するので、α-APMの収率は余り良くない。したがって、これらのα-APMの製造において生じる濾過洗液のごとき側流からの有効成分の回収が工業的にはきわめて重要となる。

【0004】回収の方法としては側流の種類により有効成分（化合物）の回収方法が各種考案されるが工業的にはいかなる有効成分を含む側流も一括して処理して、そして有効成分を回収することが望ましい。このため、従来は側流を一括して加水分解処理した後、アミノ酸であるL-フェニルアラニンおよびL-アスパラギン酸として回収することが既に知られている（特開昭57-130958号公報および特開昭63-159355号公報）。これらはいずれも鉱酸を用いて加水分解を行うものであり、加水分解時の酸濃度を高めるため側流を濃縮する前処理が必要である。

【0005】特開昭57-130958号公報ではN-ホルミル-L-アスパラギン酸無水物とL-フェニルアラニンを酢酸中にて縮合反応させてN-ホルミル-α-L-アスパルチル-L-フェニルアラニンを得て、ついで脱ホルミル化を行いα-L-アスパルチル-L-フェニルアラニンとして、つぎにメタノール性塩酸水溶液中でエステル化を行いα-APMを単離し、濾過濾液系統からの有効成分の回収の技術に関するものである。具体的には、α-異性体を分離した後の濾液を濃縮後、α-APM塩酸塩製造母液の濃縮液および塩酸と水とを添加して加水分解処理を行い、そしてまずL-フェニルアラニンを塩酸塩として析出させて分離した後、更に母液のpHをL-アスパラギン酸の等電点に調整してL-アスパラギン酸を析出させる方法を開示している。また、側流液にはペプチド誘導体以外に酢酸および蟻酸等が含まれるものもあり、このため加水分解前に低沸不純物を除去するための蒸留操作工程が開示されている。このように回収工程の随所において熱エネルギーを消費する箇所があり、効率上の問題があった。

【0006】一方、特開昭63-159355号公報は50 α-APMの製造工程において生じる母液から有効成分

【特許請求の範囲】

【請求項1】ペプチド類を含む水溶液をH⁺型強酸性陽イオン交換樹脂に通液し、ペプチド類をイオン交換樹脂に吸着させ、該イオン交換樹脂を加熱してペプチド類を加水分解反応させ、アミノ酸を回収することを特徴とするペプチド類からアミノ酸を回収する方法。

【請求項2】H⁺型強酸性陽イオン交換樹脂によるペプチド類の加水分解反応後、該樹脂よりアミノ酸類を溶離するために、アルカリ水溶液または鉱酸塩水溶液を該樹脂に通液し、該アミノ酸類を回収することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】ペプチド類が遊離のアミノ基を持つオリゴペプチドであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項4】ペプチド類がα-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル（以下α-APMと略記する）の製造工程において生じる側流に含まれるものであることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項5】α-APMの製造工程において生じる側流に含まれるペプチド類からL-フェニルアラニンおよびL-アスパラギン酸を回収するにあたり、該側流をイオン交換樹脂に通液し、ペプチド成分を該イオン交換樹脂に吸着させた後、該イオン交換樹脂を加熱してペプチドを加水分解反応させた後、該イオン交換樹脂よりL-フェニルアラニン及びL-アスパラギン酸を溶離し、各アミノ酸を分離回収することを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項6】側流がN-置換-L-アスパラギン酸誘導体とL-フェニルアラニンメチルエステルを原料としてα-APMを製造する方法で生じるものであることを特徴とする請求項4または5記載の方法。

【請求項7】溶離のアルカリ水溶液がアンモニア水、N_aOH水溶液であることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項8】陽イオン交換樹脂がスルfonyl酸基を交換基とすることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項9】加水分解の温度条件が70℃から140℃であることを特徴とする請求項1記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はペプチド類を合成及び精製する各工程において生じる該ペプチド類の副生物及び未回収ペプチド類において遊離のアミノ基を有するペプチド化合物を、強酸性陽イオン交換樹脂により加水分解して、該ペプチド類を構成するアミノ酸を回収する方法に関する。

【0002】更に詳しくは、遊離のアミノ基を有するペプチド類を含む水溶液をH⁺型強酸性陽イオン交換樹脂に通液し、該ペプチド類をイオン吸着させた後、該イオン交換樹脂を加熱し、ペプチド類の加水分解反応を行い、加水分解反応後、該イオン交換樹脂にアルカリもし

くは鉱酸塩水溶液を通液し、各アミノ酸を溶出させ該ペプチド類を構成するアミノ酸を回収する方法に関する。

【0003】

【従来の技術】ペプチド製造法に関しては、既にこれまで色々な方法が提案されている。たとえば、α-APMはペプチド人工甘味料として産業上有用な物質であり、該化合物の製造は保護基をつけたL-アスパラギン酸誘導体とL-フェニルアラニンメチルエステルとの縮合反応が開示されている。これらの縮合反応においては、目的のα-異性体の他に無視できない量のβ-APM、すなわちN-保護基-β-L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステルを副生する。また、α-APM製造工程における精製工程においても再結晶濾液のような側流には無視できない量のα-APMや関連化合物が溶解して損失するので、α-APMの収率は余り良くない。したがって、これらのα-APMの製造において生じる濾過洗液のごとき側流からの有効成分の回収が工業的にはきわめて重要となる。

【0004】回収の方法としては側流の種類により有効成分（化合物）の回収方法が各種考案されるが工業的にはいかなる有効成分を含む側流も一括して処理して、そして有効成分を回収することが望ましい。このため、従来は側流を一括して加水分解処理した後、アミノ酸であるL-フェニルアラニンおよびL-アスパラギン酸として回収することが既に知られている（特開昭57-130958号公報および特開昭63-159355号公報）。これらはいずれも鉱酸を用いて加水分解を行うものであり、加水分解時の酸濃度を高めるため側流を濃縮する前処理が必要である。

【0005】特開昭57-130958号公報ではN-ホルミル-L-アスパラギン酸無水物とL-フェニルアラニンを酢酸中にて縮合反応させてN-ホルミル-α-L-アスパルチル-L-フェニルアラニンを得て、ついで脱ホルミル化を行いα-L-アスパルチル-L-フェニルアラニンとして、つぎにメタノール性塩酸水溶液中でエステル化を行いα-APMを単離し、濾過濾液系統からの有効成分の回収の技術に関するものである。具体的には、α-異性体を分離した後の濾液を濃縮後、α-APM塩酸塩製造母液の濃縮液および塩酸と水とを添加して加水分解処理を行い、そしてまずL-フェニルアラニンを塩酸塩として析出させて分離した後、更に母液のpHをL-アスパラギン酸の等電点に調整してL-アスパラギン酸を析出させる方法を開示している。また、側流液にはペプチド誘導体以外に酢酸および蟻酸等が含まれるものもあり、このため加水分解前に低沸不純物を除去するための蒸留操作工程が開示されている。このように回収工程の随所において熱エネルギーを消費する箇所があり、効率上の問題があった。

【0006】一方、特開昭63-159355号公報はα-APMの製造工程において生じる母液から有効成分

であるL-フェニルアラニンおよびL-アスパラギン酸を回収するに際し、母液を70℃以下の条件にて濃縮を行い、つぎに鉱酸により加水分解処理を行う該アミノ酸を単離する方法を開示している。該発明においても濃縮操作があり上記問題点の検討はなされていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明はペプチド類を合成及び精製する各工程において生じる該ペプチド類の副生成物及び精製において、濾液側等に溶解して損失する遊離のアミノ基を有するペプチド類を、強酸性陽イオン交換樹脂により吸着した加水分解し、該ペプチド類を構成するアミノ酸を回収する方法を提供することである。

【0008】本発明者らは、従来技術に於いて、該ペプチド類を構成するアミノ酸を回収する方法において、①ペプチド類の鉱酸による加水分解は高濃度下で行う必要があることから、各ペプチド水溶液を濃縮し、反応中の鉱酸濃度を高める必要があること。更に、鉱酸を高温にて使用するため装置上の制限があること。

②加水分解反応後のアミノ酸回収において、各アミノ酸を鉱酸塩として回収する方法、あるいはpHを調整してアミノ酸の等電点での溶解度の差を利用し、遊離のアミノ酸として分離する方法等が知られている。

【0009】しかし、アミノ酸を該鉱酸塩で回収する場合には装置材質上に制限があり、また、pHを調整してアミノ酸の等電点において分離する場合には、加水分解反応時に鉱酸を用いているためpHは強酸性である。該アミノ酸が中性アミノ酸の場合にはpH調整を行うのに多量のアルカリ剤を添加せねばならずその為高濃度の塩が生じ、よってアミノ酸と塩との精製、分離が困難である事などの問題点を見いだした。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記問題点を解決するために鋭意検討した結果、遊離アミノ基を有するペプチド類を含む水溶液をH⁺強酸性陽イオン交換樹脂に吸着させ、そして該イオン交換樹脂を加熱することにより加水分解反応が可能であること、さらに、加水分解反応後のアミノ酸のラセミ化は僅かであり、高純度のアミノ酸を回収することが出来ることを見い出し本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち本発明は、ペプチド類を含む水溶液をH⁺強酸性陽イオン交換樹脂に通液し、ペプチド類をイオン交換樹脂に吸着させ、該イオン交換樹脂を加熱してペプチド類を加水分解反応させ、アミノ酸を回収することを特徴とするペプチド類からアミノ酸を回収する方法である。

【0012】本発明は以下に記述するような特徴を有する。すなわち、

①遊離のアミノ基を有するペプチドの水溶液を濃縮する事なくイオン交換樹脂に通液することにより回収される

こと。

②加水分解に使用される酸が遊離の形でないため加水分解後の中和生成塩とアミノ酸が混合しないこと。

③加水分解反応後に生成した該ペプチドを構成するアミノ酸を回収する目的において、該樹脂にアルカリ水溶液を通液すれば、加水分解後樹脂に吸着したアミノ酸が同時に溶出されること。

④鉱酸塩水溶液により溶出を行う場合には、該ペプチドを構成する各々のアミノ酸の等電点の低いものから順次溶離溶出し回収されること。

⑤溶離のアルカリ水溶液にアンモニア水を用いた場合には溶出水を加熱あるいは濃縮する際にアンモニアが蒸発し、濃縮終了時にはアンモニアのほとんどが留去されるため、回収時、アミノ酸の等電点において分離する場合、pH調整の必要がほとんどない為に塩が生じず回収が容易に行えること。

【0013】ここで言うペプチド類とは2個以上のアミノ酸の各々がペプチド結合したもので、特にアミノ酸の数が2~10個のオリゴペプチドと呼ばれるものを対象としている。また、ペプチド類を含む水溶液とは該ペプチド類を反応生成させた後そのペプチド類を反応液より濾別回収する際に生じる濾液及び濾液、更に精製する際に生じる濾液及び濾液であり、特にα-APMの製造工程に於て生じる側流とはα-APM反応母液、結晶単離濾液及び再結晶濾液の一つまたはそれ以上との組合せのものを意図している。

【0014】本発明において用いる陽イオン交換樹脂としてはゲル型またはポーラス型の架橋度2~20%のもので、スルファン酸を交換基とし交換容量が1.0~3.0 meq/m³のスチレン共重合物であればよい。例えばゲル型としてはレバチットTM (独国 バイエル社製) MDS 1368、ダイヤイオンTM SK 1B、ダウェックスTM (米国 ザ・ダウ・ケミカル社製) 50W-X8等が挙げられ、ポーラス型としてはレバチットTM SP 120、ダイヤイオンTM PK 216等が挙げられる。

【0015】樹脂は使用前に交換基をH⁺型にすることが必要である。H⁺型へは、例えばH₂SO₄、HCl、HNO₃等の鉱酸水溶液を樹脂に接触させる等の方法により実施される。樹脂必要量は使用に供される水溶液中に含まれるペプチド類をアミノ酸に換算したモル量、遊離のアミノ酸モル量及び陽イオン交換樹脂に吸着可能な陽イオンのモル量の総和モル数と等量以上が用いられ、好ましくは総和モル数の1.5~3.0倍である。3倍量を越して使用すればイオン交換樹脂量が膨大になり反応器の容量を拡大することになり、よってイオン交換樹脂再生に必要な酸およびアミノ酸溶出時のアルカリ量が増し、効率上の問題が生じる。

【0016】加水分解の反応温度は70℃以上からイオン交換樹脂の耐熱温度まで可能であるが、好ましくは1

であるL-フェニルアラニンおよびL-アスパラギン酸を回収するに際し、母液を70℃以下の条件にて濃縮を行い、つぎに鉱酸により加水分解処理を行う該アミノ酸を単離する方法を開示している。該発明においても濃縮操作があり上記問題点の検討はなされていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明はペプチド類を合成及び精製する各工程において生じる該ペプチド類の副生成物及び精製において、濾液側等に溶解して損失する遊離のアミノ基を有するペプチド類を、強酸性陽イオン交換樹脂により吸着した加水分解し、該ペプチド類を構成するアミノ酸を回収する方法を提供することである。

【0008】本発明者らは、従来技術に於いて、該ペプチド類を構成するアミノ酸を回収する方法において、①ペプチド類の鉱酸による加水分解は高濃度下で行う必要があることから、各ペプチド水溶液を濃縮し、反応中の鉱酸濃度を高める必要があること。更に、鉱酸を高温にて使用するため装置上の制限があること。

②加水分解反応後のアミノ酸回収において、各アミノ酸を鉱酸塩として回収する方法、あるいはpHを調整してアミノ酸の等電点での溶解度の差を利用して、遊離のアミノ酸として分離する方法等が知られている。

【0009】しかし、アミノ酸を該鉱酸塩で回収する場合には装置材質上に制限があり、また、pHを調整してアミノ酸の等電点において分離する場合には、加水分解反応時に鉱酸を用いているためpHは強酸性である。該アミノ酸が中性アミノ酸の場合にはpH調整を行うのに多量のアルカリ剤を添加せねばならずその為高濃度の塩が生じ、よってアミノ酸と塩との精製、分離が困難である事などの問題点を見いだした。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記問題点を解決するために鋭意検討した結果、遊離アミノ基を有するペプチド類を含む水溶液をH⁺強酸性陽イオン交換樹脂に吸着させ、そして該イオン交換樹脂を加熱することにより加水分解反応が可能であること、さらに、加水分解反応後のアミノ酸のラセミ化は僅かであり、高純度のアミノ酸を回収することが出来ることを見い出し本発明を完成するに至った。

【0011】すなわち本発明は、ペプチド類を含む水溶液をH⁺強酸性陽イオン交換樹脂に通液し、ペプチド類をイオン交換樹脂に吸着させ、該イオン交換樹脂を加熱してペプチド類を加水分解反応させ、アミノ酸を回収することを特徴とするペプチド類からアミノ酸を回収する方法である。

【0012】本発明は以下に記述するような特徴を有する。すなわち、

①遊離のアミノ基を有するペプチドの水溶液を濃縮する事なくイオン交換樹脂に通液することにより回収される

こと。

②加水分解に使用される酸が遊離の形でないため加水分解後の中和生成塩とアミノ酸が混合しないこと。

③加水分解反応後に生成した該ペプチドを構成するアミノ酸を回収する目的において、該樹脂にアルカリ水溶液を通液すれば、加水分解後樹脂に吸着したアミノ酸が同時に溶出されること。

④鉱酸塩水溶液により溶出を行う場合には、該ペプチドを構成する各々のアミノ酸の等電点の低いものから順次溶離溶出し回収されること。

⑤溶離のアルカリ水溶液にアンモニア水を用いた場合には溶出水を加熱あるいは濃縮する際にアンモニアが蒸発し、濃縮終了時にはアンモニアのはほとんどが留去されるため、回収時、アミノ酸の等電点において分離する場合、pH調整の必要がほとんどない為に塩が生じず回収が容易に行えること。

【0013】ここで言うペプチド類とは2個以上のアミノ酸の各々がペプチド結合したもので、特にアミノ酸の数が2~10個のオリゴペプチドと呼ばれるものを対象としている。また、ペプチド類を含む水溶液とは該ペプチド類を反応生成させた後そのペプチド類を反応液より濾別回収する際に生じる濾液及び濾洗液、更に精製する際に生じる濾液及び濾洗液であり、特にα-APMの製造工程に於て生じる側流とはα-APM反応母液、結晶単離濾洗液及び再結晶濾洗液の一つまたはそれ以上との組合せのものを意図している。

【0014】本発明において用いる陽イオン交換樹脂としてはゲル型またはポーラス型の架橋度2~20%のもので、スルфон酸を交換基とし交換容量が1.0~3.0 meq/mlのスチレン共重合物であればよい。例えばゲル型としてはレバチットTM (独国 バイエル社製) MDS 1368、ダイヤイオンTM SK 1B、ダウェックスTM (米国 ザ・ダウ・ケミカル社製) 50W-X8等が挙げられ、ポーラス型としてはレバチットTM SP 120、ダイヤイオンTM PK 216等が挙げられる。

【0015】樹脂は使用前に交換基をH⁺型にすることが必要である。H⁺型へは、例えばH₂SO₄、HCl、HNO₃等の鉱酸水溶液を樹脂に接触させる等の方法により実施される。樹脂必要量は使用に供される水溶液中に含まれるペプチド類をアミノ酸に換算したモル量、遊離のアミノ酸モル量及び陽イオン交換樹脂に吸着可能な陽イオンのモル量の総和モル数と等量以上が用いられ、好ましくは総和モル数の1.5~3.0倍である。3倍量を越して使用すればイオン交換樹脂量が膨大になり反応器の容量を拡大することになり、よってイオン交換樹脂再生に必要な酸およびアミノ酸溶出時のアルカリ量が増し、効率上の問題が生じる。

【0016】加水分解の反応温度は70℃以上からイオン交換樹脂の耐熱温度まで可能であるが、好ましくは1

00～120℃であり、反応時間は反応温度により決定されるが、2～60時間の反応時間があれば十分である。所定時間反応後、必要に応じて水を通して樹脂を洗浄する。ペプチド類を構成するアミノ酸のうち、酸性アミノ酸の一部やペプチド類中に残存するアミノ酸の保護基が洗浄液中に遊離する場合があり、この洗浄液中のアミノ酸を回収するにはさらにイオン交換樹脂に通液するか、あるいは濃縮、濾過により回収する方法が可能である。加水分解にて生じたアミノ酸は、洗浄もしくは未洗浄の樹脂にアルカリ水溶液または鉱酸塩水溶液を通液し溶出する。

【0017】アルカリ水溶液としてはアンモニア水あるいはNaOH水溶液等が用いられる。アンモニア水は溶出液の濃縮時に蒸発溶去が出来ることから、より好ましいアルカリ水溶液である。アルカリ水溶液をアミノ酸が吸着した樹脂に通液すれば、該ペプチドを構成する各々のアミノ酸が同時に溶出される。鉱酸塩水溶液を通液し溶出を行うと該ペプチドを構成する各々のアミノ酸の等電点により分離して溶出される。溶離液中のアルカリまたは鉱酸塩の量はイオン交換樹脂の総交換容量以上であればよい。アルカリ水溶液の濃度としては0.1M程度の希薄な溶液でも溶離には十分であるが、アルカリの濃度が高すぎると、イオン交換樹脂の周りで結晶化することがあるため、アミノ酸の結晶化が生じない濃度範囲のアルカリを用いるのが好ましい。

【0018】溶出液の温度は高温であるほど通過液のアミノ酸、例えばL-フェニルアラニンの溶解度を上げるので溶出時間の短縮およびアルカリ溶液の使用量を削減できる、しかし高温であれば溶出アミノ酸のラセミ化が生じ易くなるので、50℃以下で行うのが好ましい。溶出に用いる鉱酸塩水溶液としては硫酸、塩酸、硝酸塩の水溶液等があげられる。

【0019】樹脂を用いて加水分解後の反応溶液から各々のアミノ酸を単離する方法としては、例えば、 α -APMの場合には、加水分解後に硫酸アンモニウム水溶液を溶離液に用いて溶出すると、先ずL-アスパラギン酸が溶出し、続いてL-フェニルアラニンが溶出される。また、溶離時に2種の溶離液を用いる方法では、先ず硫酸アンモニウム水溶液によりL-アスパラギン酸を溶出後、溶離剤をアンモニア水に変えれば、L-フェニルアラニンがアンモニア水溶液として得られ、その溶出液を特定濃度まで濃縮後、晶析、濾別操作により、精L-フェニルアラニンが得られる。

【0020】初めに溶出したL-アスパラギン酸を含む溶液も同様に濃縮し濃縮終了液のpHをL-アスパラギン酸の等電点に調整した後、晶析、濾別操作により、精L-アスパラギン酸が容易に得られる。同じく α -APMを樹脂により加水分解した後、該樹脂からのアミノ酸の溶離にアンモニア水溶液を溶離液に用いればL-アスパラギン酸及びL-フェニルアラニンが同時に溶出さ

れ、該溶出液を特定濃度まで濃縮後、晶析、濾別操作により、精L-フェニルアラニンが容易に得られる。L-フェニルアラニンを濾別した濾液を更に特定濃度まで濃縮し濃縮終了液のpHをL-アスパラギン酸の等電点に調整した後、晶析、濾別操作により精L-アスパラギン酸が得られる。

【0021】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例1

数種の樹脂を用いて α -APMの加水分解を行った。 α -APM 3.9. 24g (0.1333モル) を α -APMモル量に対して3倍の交換容量を持つ各々の樹脂に吸着後、加水分解反応を120℃で6時間行った。加水分解終了後、各々の樹脂に吸着しているL-フェニルアラニン (以下L-Ph eと略す) とL-アスパラギン酸 (L-A s pと略す) の全量をアンモニア水溶液にて溶出し、溶液中のL-Ph e量を求め、吸着した α -APMに対するL-Ph eの回収率を表1に示した。

【0022】

【表1】

表1 樹脂の各銘柄による加水分解

| イオン交換樹脂名 | 回収率 (%) |
|----------------|---------|
| ダイヤイオン SK 1B | 95.4 |
| ダイヤイオン PK 216 | 93.9 |
| レバチット SP 120 | 91.1 |
| レバチット S 100 | 92.3 |
| レバチット K 1411 | 94.1 |
| レバチット MDS 1368 | 94.9 |

加水分解条件 120℃/6時間

【0023】実施例2

α および β 体の等モル存在するAPM溶液 6.2. 5g (APM 1.6%, 1.0g, 3.398ミリモル) 中にH⁺型に調整した強酸性陽イオン交換樹脂 (バイエル社製 MDS-1368) の総交換容量がAPMモル量に対して1、2、3倍量の樹脂を添加し攪拌によりAPMを吸着させた。その後、密閉型の試験管に樹脂を移し替え、100℃下に20時間加水分解反応を行った。冷却後、その樹脂に吸着しているL-Ph eとL-A s pの全量をアンモニア水溶液で溶出し、その溶液中のL-Ph e量を求め、吸着したAPMに対する回収率を表2に示した。APMに対して樹脂量が多いほど加水分解反応が早く進行する。

00～120℃であり、反応時間は反応温度により決定されるが、2～60時間の反応時間があれば十分である。所定時間反応後、必要に応じて水を通して樹脂を洗浄する。ペプチド類を構成するアミノ酸のうち、酸性アミノ酸の一部やペプチド類中に残存するアミノ酸の保護基が洗浄液中に遊離する場合があり、この洗浄液中のアミノ酸を回収するにはさらにイオン交換樹脂に通液するか、あるいは濃縮、濃過により回収する方法が可能である。加水分解にて生じたアミノ酸は、洗浄もしくは未洗浄の樹脂にアルカリ水溶液または鉱酸塩水溶液を通液し溶出する。

【0017】アルカリ水溶液としてはアンモニア水あるいはNaOH水溶液等が用いられる。アンモニア水は溶出液の濃縮時に蒸発溜去が出来ることから、より好ましいアルカリ水溶液である。アルカリ水溶液をアミノ酸が吸着した樹脂に通液すれば、該ペプチドを構成する各々のアミノ酸が同時に溶出される。鉱酸塩水溶液を通液し溶出を行うと該ペプチドを構成する各々のアミノ酸の等電点により分離して溶出される。溶離液中のアルカリまたは鉱酸塩の量はイオン交換樹脂の総交換容量以上であればよい。アルカリ水溶液の濃度としては0.1M程度の希薄な溶液でも溶離には十分であるが、アルカリの濃度が高すぎると、イオン交換樹脂の周りで結晶化があるため、アミノ酸の結晶化が生じない濃度範囲のアルカリを用いるのが好ましい。

【0018】溶出液の温度は高温であるほど通過液のアミノ酸、例えばL-フェニルアラニンの溶解度を上げるので溶出時間の短縮およびアルカリ溶液の使用量を削減できる、しかし高温であれば溶出アミノ酸のラセミ化が生じ易くなるので、50℃以下で行うのが好ましい。溶出に用いる鉱酸塩水溶液としては硫酸、塩酸、硝酸塩の水溶液等があげられる。

【0019】樹脂を用いて加水分解後の反応溶液から各々のアミノ酸を単離する方法としては、例えば、 α -APMの場合には、加水分解後に硫酸アンモニウム水溶液を溶離液に用いて溶出すると、先ずL-アスパラギン酸が溶出し、続いてL-フェニルアラニンが溶出される。また、溶離時に2種の溶離液を用いる方法では、先ず硫酸アンモニウム水溶液によりL-アスパラギン酸を溶出後、溶離剤をアンモニア水に変えれば、L-フェニルアラニンがアンモニア水溶液として得られ、その溶出液を特定濃度まで濃縮後、晶析、濃別操作により、精L-フェニルアラニンが得られる。

【0020】初めに溶出したL-アスパラギン酸を含む溶液も同様に濃縮し濃縮終了液のpHをL-アスパラギン酸の等電点に調整した後、晶析、濃別操作により、精L-アスパラギン酸が容易に得られる。同じく α -APMを樹脂により加水分解した後、該樹脂からのアミノ酸の溶離にアンモニア水溶液を溶離液に用いればL-アスパラギン酸及びL-フェニルアラニンが同時に溶出さ

れ、該溶出液を特定濃度まで濃縮後、晶析、濃別操作により、精L-フェニルアラニンが容易に得られる。L-フェニルアラニンを濃縮した濃縮液を更に特定濃度まで濃縮し濃縮終了液のpHをL-アスパラギン酸の等電点に調整した後、晶析、濃別操作により精L-アスパラギン酸が得られる。

【0021】

【実施例】以下、本発明を実施例により具体的に説明する。

実施例1

数種の樹脂を用いて α -APMの加水分解を行った。 α -APM 3.9. 24 g (0.133モル)を α -APMモル量に対して3倍の交換容量を持つ各々の樹脂に吸着後、加水分解反応を120℃で6時間行った。加水分解終了後、各々の樹脂に吸着しているL-フェニルアラニン(以下L-Ph eと略す)とL-アスパラギン酸(L-Aspと略す)の全量をアンモニア水溶液にて溶出し、溶液中のL-Ph e量を求め、吸着した α -APMに対するL-Ph eの回収率を表1に示した。

【0022】

【表1】

表1 樹脂の各銘柄による加水分解

| イオン交換樹脂名 | 回収率(%) |
|----------------|--------|
| ダイヤイオン SK 1B | 95.4 |
| ダイヤイオン PK 216 | 93.9 |
| レバチット SP 120 | 91.1 |
| レバチット S 100 | 92.3 |
| レバチット K 1411 | 94.1 |
| レバチット MDS 1368 | 94.9 |

加水分解条件 120℃/6時間

【0023】実施例2

α および β 体の等モル存在するAPM溶液 6.2. 5 g (APM 1.6%, 1.0 g, 3.398ミリモル)中にH⁺型に調整した強酸性陽イオン交換樹脂(バイエル社製 MDS-1368)の総交換容量がAPMモル量に対して1.2.3倍量の樹脂を添加し攪拌によりAPMを吸着させた。その後、密閉型の試験管に樹脂を移し替え、100℃下に20時間加水分解反応を行った。冷却後、その樹脂に吸着しているL-Ph eとL-Aspの全量をアンモニア水溶液で溶出し、その溶液中のL-Ph e量を求め、吸着したAPMに対する回収率を表2に示した。APMに対して樹脂量が多いほど加水分解反応が早く進行する。

【0024】

7

8

* * 【表2】

表2 加水分解時使用樹脂量と回収率の関係

| | | | |
|---------------------------------|------|------|------|
| (meq/ml樹脂) / α -APM mmol | 1 | 2 | 3 |
| 回収率 (%) | 80.3 | 95.4 | 98.7 |

加水分解条件 100°C/20時間

【0025】実施例3

α -APM 1.0 g (3.398ミリモル)を実施例2と同じ強酸性陽イオン交換樹脂を総交換容量が α -APMモル量に対して3倍量の樹脂中(10.2ml)に添加し更に水を10g加え攪拌により α -APMを溶解吸着させた。その後、耐圧容器に樹脂を移し替え、80, 100, 110, 120, 130°Cの温度下で加水※

※分解反応を行った。反応時間は表3に示している。冷却後、その樹脂に吸着しているL-PheとL-Aspの全量をアンモニア水溶液にて溶出し、その溶液中のL-Phe量を求め、吸着したAPMに対する回収率を表3に示す。加水分解温度が高いほど反応が早く進行する。

【0026】

【表3】

表3 加水分解時温度と回収率

| 加水分解温度 (°C) | 80 | 100 | 110 | 120 | 130 |
|---------------|-------|-------|------|-------|------|
| 8Hr・回収率 (%) | - | - | 95.3 | 100.0 | 96.2 |
| 10Hr・回収率 (%) | 75.7 | 100.0 | - | - | - |
| 20Hr・回収率 (%) | - | 100.0 | - | - | - |
| 100Hr・回収率 (%) | 100.0 | - | - | - | - |

(meq/ml樹脂) / α -APM mmol = 3 の樹脂量とした。

【0027】実施例4

α -APM 39.24 g (0.1333モル)を実施例2と同じ強酸性陽イオン交換樹脂の総交換容量が α -APMモル量に対して3倍量の樹脂中に添加し更に水を200g加え攪拌により α -APMを溶解吸着させた。その後、耐圧容器に樹脂を移し替え、110°Cで加水分解反応を2、4、6、8、10時間行った。それぞれを★

★冷却した後、その樹脂に吸着しているL-PheとL-Aspの全量をアンモニア水溶液にて溶出し、その溶液中のL-Phe量を求め、吸着した α -APMに各加水分解時間に於けるL-Phe回収率を表4に示す。反応温度110°Cでは反応4時間目でほぼ終点に達する。

【0028】

【表4】

表4 加水分解 (110°C) 時間と回収率

| 反応時間 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
|---------|------|------|------|------|------|
| 回収率 (%) | 79.8 | 92.3 | 86.9 | 90.1 | 96.0 |

(meq/ml樹脂) / α -APM mmol = 3 の樹脂量とした。

【0029】実施例5

α -APM 8.84 g (0.030モル)を含有する水溶液650gをH⁺型に調整した強酸性陽イオン交換樹脂(レバチット社製 MDS-1368)90mlを充填したカラム(Φ25×200)に通液吸着させた後、100°Cで加水分解反応を20時間行った。冷却後、蒸留水を通じて遊離したL-PheとL-Aspとを溶出した。〔画分-1 L-Phe 0.064 g (1.3%)、L-Asp 0.38 g (11.7%)〕その後、1%アンモニア水を通じて樹脂に吸着しているL-PheとL-Aspを溶出した。〔画分-2 L-Phe 4.89 g (98.6%)、L-Asp 3.53 g (88.3%)〕。

* : () 内は吸着させた α -APMに対するモル分率。

【0030】画分-2を減圧下、65°Cで濃縮した後に、濾過によりL-Pheの結晶8.41gを得た。回収率83.3% (対 α -APM)。尚結晶中にD-フェニルアラニンの存在は認められなかった。L-Pheを濾別した際の濾液に硫酸をpHが2.7になるまで徐々に添加し、濾過によりL-Aspの結晶4.23gを得た。回収率83.3% (対 α -APM)。尚、結晶中にD-アスパラギン酸の存在は認められなかった。

2 L-Phe 4.89 g (98.6%)、L-Asp 3.53 g (88.3%)

【0031】実施例5

【0024】

7

8

* * 【表2】

表2 加水分解時使用樹脂量と回収率の関係

| (meq/ml樹脂) / α -APM mmol | 1 | 2 | 3 |
|---------------------------------|------|------|------|
| 回収率 (%) | 80.3 | 95.4 | 98.7 |

加水分解条件 100°C/20時間

【0025】実施例3

α -APM 1.0 g (3.398ミリモル)を実施例2と同じ強酸性陽イオン交換樹脂を総交換容量が α -APMモル量に対して3倍量の樹脂中(10.2ml)に添加し更に水を10g加え攪拌により α -APMを溶解吸着させた。その後、耐圧容器に樹脂を移し替え、80、100、110、120、130°Cの温度下で加水※

※分解反応を行った。反応時間は表3に示している。冷却後、その樹脂に吸着しているL-PheとL-Aspの全量をアンモニア水溶液にて溶出し、その溶液中のL-Phe量を求め、吸着したAPMに対する回収率を表3に示す。加水分解温度が高いほど反応が早く進行する。

【0026】

【表3】

表3 加水分解時温度と回収率

| 加水分解温度 (°C) | 80 | 100 | 110 | 120 | 130 |
|---------------|-------|-------|------|-------|------|
| 8Hr・回収率 (%) | - | - | 95.3 | 100.0 | 96.2 |
| 10Hr・回収率 (%) | 75.7 | 100.0 | - | - | - |
| 20Hr・回収率 (%) | - | 100.0 | - | - | - |
| 100Hr・回収率 (%) | 100.0 | - | - | - | - |

(meq/ml樹脂) / α -APM mmol = 3 の樹脂量とした。

★冷却した後、その樹脂に吸着しているL-PheとL-Aspの全量をアンモニア水溶液にて溶出し、その溶液中のL-Phe量を求め、吸着した α -APMに各加水分解時間に於けるL-Phe回収率を表4に示す。反応温度110°Cでは反応4時間目でほぼ終点に達する。

【0027】実施例4

α -APM 39.24 g (0.1333モル)を実施例2と同じ強酸性陽イオン交換樹脂の総交換容量が α -APMモル量に対して3倍量の樹脂中に添加し更に水を200g加え攪拌により α -APMを溶解吸着させた。その後、耐圧容器に樹脂を移し替え、110°Cで加水分解反応を2、4、6、8、10時間行った。それぞれを★

【0028】

【表4】

表4 加水分解 (110°C) 時間と回収率

| 反応時間 | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
|---------|------|------|------|------|------|
| 回収率 (%) | 79.8 | 92.3 | 86.9 | 90.1 | 96.0 |

(meq/ml樹脂) / α -APM mmol = 3 の樹脂量とした。

s p 3.53 g (88.3%)]。

【0029】実施例5

α -APM 8.84 g (0.030モル)を含有する水溶液650gをH⁺型に調整した強酸性陽イオン交換樹脂(レバチット社製 MDS-1368)90mlを充填したカラム(Φ25×200)に通液吸着させた後、100°Cで加水分解反応を20時間行った。冷却後、蒸留水を通じて遊離したL-PheとL-Aspとを溶出した。〔画分-1 L-Phe 0.064 g (1.3%)、L-Asp 0.38 g (11.7%)〕その後、1%アンモニア水を通じて樹脂に吸着しているL-PheとL-Aspを溶出した。〔画分-2 L-Phe 4.89 g (98.6%)、L-Asp 50

40 * : () 内は吸着させた α -APMに対するモル分率。

【0030】画分-2を減圧下、65°Cで濃縮した後に、濾過によりL-Pheの結晶8.41 gを得た。回収率83.3% (対 α -APM)。尚結晶中にD-フェニルアラニンの存在は認められなかった。L-Pheを濾別した際の濾液に硫酸をpHが2.7になるまで徐々に添加し、濾過によりL-Aspの結晶4.23 gを得た。回収率83.3% (対 α -APM)。尚、結晶中にD-アスパラギン酸の存在は認められなかった。

【0031】実施例5

α -APM 8.84 g (0.030 モル) を含有する水溶液650 g を実施例-4と同じ様に、100℃で加水分解反応を20時間行った。冷却後、蒸留水を通水して遊離したL-PheとL-Aspとを溶出した〔画分-1 L-Phe 0.10 g (1.0%)、L-Asp 0.36 g (9.6%)〕。その後、0.1M-硫酸アンモニウム水溶液470 g を通液して溶離を行ない、L-Aspを主成分とする画分〔画分-2 L-Asp 6.15 g (77.0%)、L-Phe 1.14 g (11.5%)〕を得た。

〔0032〕その後、1%アンモニア水337 g を通液して溶離を行ないL-Pheを主成分とする画分〔画分-3 L-Phe 7.934 g (80.0%)、L-Asp 0.707 g (8.9%)〕を得た、更に蒸留水50 g によりカラム内を洗浄した〔画分-4 L-Phe 0.877 g (8.8%)〕。

*: () 内は吸着させた α -APMに対するモル分率。

〔0033〕画分-2を減圧下65℃で濃縮、冷却後、硫酸を添加して溶液中のpHを2.0に調整後、濾過によりL-Aspの結晶3.80 gを得た。L-Asp: L-Phe = 91.4: 8.6。回収率34.8% (対 α -APM)。尚、結晶中にD-アスパラギン酸の存在は認められなかった。

〔0034〕画分-3を減圧下65℃で濃縮。冷却後、濾過によりL-Pheの結晶6.60 gを得た。回収率66.6% (対 α -APM)。尚、結晶中にL-Asp及びD-フェニルアラニンの存在は認められなかった。

〔0035〕

【発明の効果】ペプチド類から強酸性陽イオン交換樹脂を用い、加水分解し、その構成アミノ酸を効率よく回収することが出来る。

α -APM 8.84 g (0.030 モル) を含有する水溶液650 g を実施例-4と同じ様に、100°Cで加水分解反応を20時間行った。冷却後、蒸留水を通液して遊離したL-PheとL-Aspとを溶出した〔画分-1 L-Phe 0.10 g (1.0%)、L-Asp 0.36 g (9.6%)〕。その後、0.1M-硫酸アンモニウム水溶液470 g を通液して溶離を行ない、L-Aspを主成分とする画分〔画分-2 L-Asp 6.15 g (77.0%)、L-Phe 1.14 g (11.5%)〕を得た。

【0032】その後、1%アンモニア水337 g を通液して溶離を行ないL-Pheを主成分とする画分〔画分-3 L-Phe 7.934 g (80.0%)、L-Asp 0.707 g (8.9%)〕を得た、更に蒸留水50 g によりカラム内を洗浄した〔画分-4 L-Phe 0.877 g (8.8%)〕。

* : () 内は吸着させた α -APMに対するモル分率。

【0033】画分-2を減圧下6.5°Cで濃縮、冷却後、硫酸を添加して溶液中のpHを2.0に調整後、濾過によりL-Aspの結晶3.80 gを得た。L-Asp : L-Phe = 91.4 : 8.6。回収率34.8% (対 α -APM)。尚、結晶中にD-アスパラギン酸の存在は認められなかった。

【0034】画分-3を減圧下6.5°Cで濃縮。冷却後、濾過によりL-Pheの結晶6.60 gを得た。回収率66.6% (対 α -APM)。尚、結晶中にL-Asp及びD-フェニルアラニンの存在は認められなかった。

【0035】

【発明の効果】ペプチド類から強酸性陽イオン交換樹脂を用い、加水分解し、その構成アミノ酸を効率よく回収することが出来る。